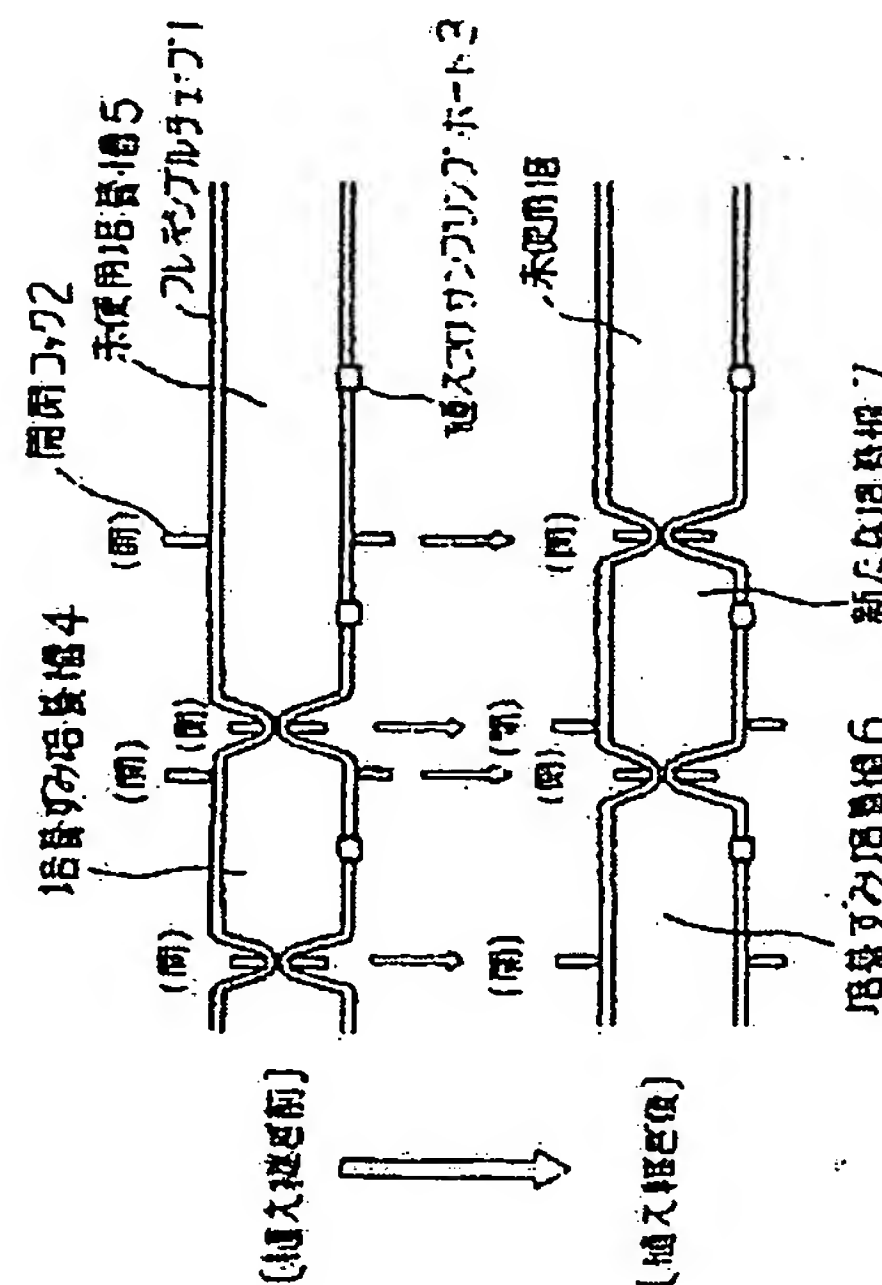


**BEST AVAILABLE COPY**  
**EUROPEAN PATENT OFFICE**

**Patent Abstracts of Japan**

PUBLICATION NUMBER : 03030665  
PUBLICATION DATE : 08-02-91  
  
APPLICATION DATE : 28-06-89  
APPLICATION NUMBER : 01163729  
  
APPLICANT : MITSUBISHI HEAVY IND LTD;  
  
INVENTOR : NISHIATSUKO;  
  
INT.CL. : C12M 1/32  
  
TITLE : AUTOMATICALLY SUBCULTURING  
DEVICE



**ABSTRACT :** PURPOSE: To readily and automatically carry out subculture of microorganism, cell, etc., by opening and closing a flexible tube containing a culture medium packed therein with a number of cocks in the longitudinal direction and blending a culture medium of a microorganism with the new culture medium.

CONSTITUTION: A culture medium is packed into the inside of a flexible tube 1 capable of sterilizing bacterium and made of flexible material having O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> permeable properties and the tube is fastened at the prescribed positions with a number of and closing cock 2 in longitudinal direction to prepare the culture tank. Then microorganism or cell is cultured in the culture tank and after definite time, culture medium is blended with new culture medium by moving a fastening position of cock in a state in which microorganism or cell is sufficiently proliferated. Thus, new culture tank is prepared to automatically carry out subculture of microorganism or cell, etc.

COPYRIGHT: (C)1991, JPO&Japio

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-30665

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)2月8日

C 12 M 1/32

8717-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 自動植え継ぎ装置

⑯ 特 願 平1-163729

⑰ 出 願 平1(1989)6月28日

⑱ 発 明 者 岡 崎 洋 兵庫県神戸市兵庫区和田崎町1丁目1番1号 三菱重工業株式会社神戸造船所内

⑲ 発 明 者 高 沖 宗 夫 兵庫県神戸市兵庫区和田崎町1丁目1番1号 三菱重工業株式会社神戸造船所内

⑳ 発 明 者 松 本 浩 明 兵庫県神戸市兵庫区和田崎町1丁目1番1号 三菱重工業株式会社神戸造船所内

㉑ 発 明 者 西 敦 子 兵庫県神戸市兵庫区小松通5丁目1番16号 株式会社神菱ハイテック内

㉒ 出 願 人 三菱重工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番1号

㉓ 代 理 人 弁理士 内 田 明 外2名

# 明 細 書

## 1 発明の名称

自動植え継ぎ装置

## 2 特許請求の範囲

培地を充填したフレキシブルチューブと、該チューブを締めつけたり緩めたりすることができ多数のコックを該チューブの長手方向に適宜間隔をおいて多数設けてなることを特徴とする微生物、細胞などの自動植え継ぎ装置。

## 3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はセルライン(cell-line)を確保するよう予備的な培養操作を自動化した自動継代培養装置に適用される微生物、細胞などの自動植え継ぎ装置に関する。

(従来技術)

従来、微生物、細胞などの植え継ぎは、フラスコ又はガラス製の培養容器(ビン、フラスコ、シャーレ、チューブ等)とピペットを用いてすべて人手で行われている。植え継ぎ操作

は無菌的に行う必要があるため、バイオクリーンベンチ内で行うのが普通である。

これまでに、微生物、細胞などの植え継ぎを自動的に行うような装置は存在していない。

(発明が解決しようとする課題)

微生物や細胞を培養する場合、新しい環境に馴らすために予備培養と植え継ぎを数回くり返すのが普通である。又凍結に弱い細胞の場合には株を保存する目的のためだけでも培養と植え継ぎをくり返さなければならない。さらに植え継ぎ操作は所定の時間に行わなければならないので休日出勤を余蘚なくされるなど、研究員に対する負荷は大きい。又宇宙における実験では作業時間が制限されることから、実験操作の自動化は必須である。

本発明は上記技術水準に鑑み、微生物、細胞などを自動的に植え継ぎすることができる装置を提供しようとするものである。

(課題を解決するための手段)

本発明は培地を充填したフレキシブルチューブ

ブと、該チューブを締めつけたり緩めたりすることができ多数のコックを該チューブの長手方向に適宜間隔を置いて多数設けてなることを特徴とする微生物、細胞などの自動植え替え装置である。

#### (作用)

フレキシブルな材質からなるチューブの内側に培地を満たし、チューブの所定の位置をコックで締めつけて一定容量の培養槽を作る。この槽内で微生物又は細胞を培養し、一定時間後微生物又は細胞が十分に増殖したらコックの締めつけ位置を移動させて、増殖した微生物又は細胞の入った培養液と新しい培地が一定の割合で混合するようにして、新しい培養槽を作る。この操作をくり返すことにより、一定時間毎に自動的に植え替えを行う。

本発明装置はメカニズムが単純であるため自動化が容易である。さらにこのような操作は無断的に行う必要があるが、本発明装置によれば培養液が直接外気に接触しないため、汚染の危

うとする場合、まず培養済み培養槽4を9:1に分割する部位のコック2と未使用培養槽5から9ccの培地を分取する部位のコック2を閉めると同時に、植え替え前に培養済み培養槽4を形づくっていた2個所のコック2を開ける。これら一連の操作により、新たな培養槽7の中には培養済み培養液1ccと新しい培地9ccが混入することになる。その状態の一例を第1図の下図に示す。この下図の新たな培養槽7が前操作の培養済み培養液1ccと未使用培養槽5の培地9ccを含む槽である。

植え替え操作に関しては厳密な定量性は要求しないものゝ、ある程度の定量性は必要である。本発明装置の場合、例えば1/100に希釈しようとする時には、非常に長いチューブを用いない限り無理がある。そこで1/10希釈操作を連続的に2回行うことによつて1/100の希釈が対応できる。

コック2の開閉機構は多数のコックを設置し順に開閉してゆく方法と、2個のコック2を1

組として4個のコック2をもつてチューブ1やコック2の位置をずらしながら開閉してゆく方法等が考えられる。

#### (実施例)

本発明装置の一実施例を第1図によつて説明する。

フレキシブルチューブ1は滅菌が可能でO<sub>2</sub>及びCO<sub>2</sub>透過性を有する材質からなるものが用いられる。又植えつけや培養液の回収を行う際に注射針をつき刺す必要があるため、チューブ1には注射針を刺しても液もれしない植えつけ・サンプリングポート3を設けることが好ましい。適当な間隔に設置したコック2の開閉により、培養液と新しい培地を混合することにより植え替えを行なう。この際培養液と新しい培地との混合比は1:9を限度とし、高倍率の希釈が必要な場合は連続して同じ操作をくり返すことに対応する。例えば第1図の培養済み培養槽4の中に培養液が10cc入っているとす。又未使用培養槽5には新しい培地が入っている。この培養済み培養液1ccと新しい培地9ccを混合し

組として4個のコック2をもつてチューブ1やコック2の位置をずらしながら開閉してゆく方法等が考えられる。

又、付着性細胞を培養する場合には、培地にマイクロキャリア等の支持材を混ぜることに対応する。

第2図は第1図中の開閉コック2とフレキシブルチューブ1の一部について本発明装置を適用した自動連続培養装置の機能ブロック図を示す。この装置はフレキシブルチューブ、開閉コック、自動開閉機構、制御機構及び攪拌機構からなる。攪拌の手法としてはフレキシブルチューブ内にマグネットの回転子を封入し、フレキシブルチューブの外側からスターラーを用いて回転させる方法や、フレキシブルチューブを外側からしごく方法等が適用可能であり、これにより培養槽の内容物を均一化し、適正な植え替えを可能とする。又培養時の環境(温度、湿度、ガス成分)を制御するため、この装置はインキュベータ内で使用する。

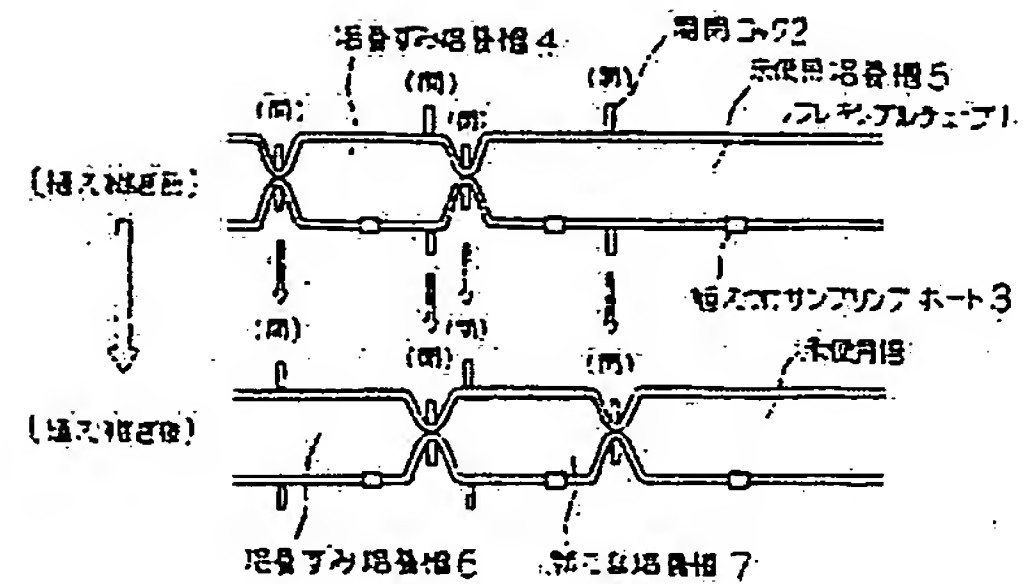
〔發明の効果〕

本発明により、微生物、細胞などの固定培養の自動化を図ることが容易となる。

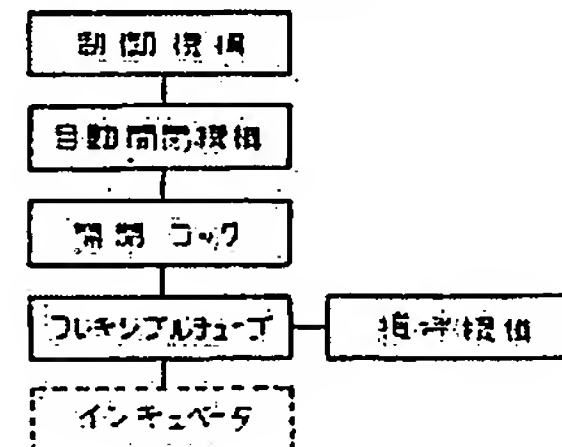
#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は本発明の実施例の説明図、第 2 図は本発明を適用した自動組代培養装置の機能ブロック図である。

部 1 図



第2回



代理人	内田	明
代理人	坂原	一矢
代理人	安西	寛

(19) Japan Patent Office (JP)

(11) Japanese Patent  
Application Laid-Open

(12) Japanese Unexamined Patent Application Publication (A) No. **H3-30665**

⑤Int. Cl. <sup>9</sup>

Class. symbol

Internal reference No.

(43) Published date: February 8, 1991

C 12 M 1/32

8717-4B

Request for examination: not requested  
Number of claims:

(Total of 3 pages [in the original])

(54) Title of the Invention: **AUTOMATIC SUBCULTURING DEVICE**

(21) Japanese Patent Application No. H1-163729

(22) Filing date: June 28, 1989

(72) Inventor: Hiroshi OKAZAKI

C/O Kobe Shipbuilding Yard, Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.  
1-1, Wadasaki-cho 1-chome, Hyogo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken

(72) Inventor: Munao TAKAOKI

C/O Kobe Shipbuilding Yard, Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.  
1-1, Wadasaki-cho 1-chome, Hyogo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken

(72) Inventor: Hiroaki MATSUMOTO

C/O Kobe Shipbuilding Yard, Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.  
1-1, Wadasaki-cho 1-chome, Hyogo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken

(72) Inventor: Atsuko NISHI

C/O Shinryo High Technologies, Ltd.  
1-16, Komatsu-dori 5-chome, Hyogo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken

(71) Applicant: Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.

5-1, Marunouchi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo

(74) Agent: Patent attorney: Akira UCHIDA

and two others

## Specification

### 1. Title of the Invention

**AUTOMATIC SUBCULTURING DEVICE**

### 2. Scope of Claims

An automatic subculturing device for microscopic organisms or cells comprising a flexible tube where a culture medium is filled, and many clamp valves that can tighten or loosen said tube arranged in a longitudinal direction at approximate intervals.

### 3. Detailed Description of the Invention

#### [Industrial Field]

The present invention relates to an automatic subculturing device for microscopic organisms or cells to be applied for an automatic successive subculturing device where a preliminary culturing operation is automated to secure a cell-line.

#### [Related Art]

Conventionally, microscopic organisms or cells manually cultured using a plastic or glass culturing container (such as pin, flask, Petri dish or tube) and a pipette. Since it is necessary to aseptically conduct the subculturing operation, it is normal for it to be conducted on a bio-clean bench.

Heretofore there has been no device available to automatically subculture microscopic organisms or cells.

#### [Problem Overcome by the Invention]

In the case of culturing microscopic organisms or cells, it is normal to repeat preliminary culture and subculture several times in order for it to be climatized. Further, in the case of cells susceptible to freezing, culturing and subculturing have had to be repeated for the purpose of storing strains. Because the subculture operation has to be conducted at a predetermined time, the burden on a researcher is great, and he may have to work on a weekend. Further, in the experimental universe, since the working time is limited, automation of test operations is essential.

Taking technical standards into consideration, the objective of the present invention is to provide a device capable of automatically subculturing microscopic organisms or cells.

#### [Problem Resolution Means]

The present invention is an automatic subculturing device for microscopic organisms or cells characterized by comprising a flexible tube where a culture medium is filled, and many clamp valves that can tighten or loosen said tube are arranged in a longitudinal direction at appropriate intervals.

#### [Operation]

A tube made from a flexible material is filled with a culture medium, and fermenters with a constant volume by clamping the predetermined positions of the



tube with the clamp valves, and when the microscopic organisms or cells sufficiently grow after a certain time period, the cock tightening positions are shifted, so the culture containing the grown microscopic organisms or cells and a new culture medium can be mixed at a constant ratio, and then new fermenters are made.

Repeating this operation results in automatic subculturing in constant time periods.

Since the present invention device has a simple mechanism, automation is easy. In addition, it is necessary to aseptically conduct this operation. With the present invention device, the culture will never directly make contact with the outside air, so the risk of contamination is less. Further, it is also possible to operate the device not only above the ground but also under zero gravity.

[Embodiment]

An embodiment of the present invention device is described hereafter with reference to FIG. 1.

For a flexible tube 1, a tube made from a material that enables sterilization and has O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> permeability is used. Further, since a needle needs to be stuck into the tube on the occasion of implantation or recovery of culture, it is preferable to establish an implanting/sampling port 3 where no liquid leaks even when the needle is stuck. Subculturing is conducted by mixing the culture and new culture medium due opening/closing of clamp valves 2 arranged at appropriate intervals. On this occasion, for a mixing ratio of the culture and a new culture medium, the ratio of 1:9 is limited, and when high diluting ratio is necessary, the same operation should successively be repeated. For example, 10 cc of culture is in the cultured fermenter 4 in FIG. 1.

Further, a new culture medium is contained within an unused fermenter 5. In the case of mixing 1 cc of cultured culture and 9 cc of new culture medium, first, the clamp valve 2 at the site to divide the cultured fermenter 4 at 9:1 and the clamp valve 2 at the site to batch off 9 cc of culture medium from the unused fermenter 5 are closed. Simultaneously, the clamp valves 2 at two sections forming the cultured fermenter 4 before subculturing are opened.

These series of operations results in mixing 1 cc of cultured culture 1 and 9cc of new culture medium in a new fermenter 7. An example of this is shown in the lower diagram of FIG. 1. The new fermenter 7 in the lower diagram is a fermenter containing 1 cc of cultured culture in the previous operation and the 9 cc in the unused fermenter 5.

Regarding the subculturing operation, even though a strict quantitiveness is not required, a certain level of quantitiveness is necessary. In the case of the present invention device, for example, when [the culture] is diluted to 1/100, it is reasonably impossible unless a very long tube is used. Then, successive diluting operation is conducted twice that realizes the dilution to 1/100.

For the opening/closing mechanism for the clamp valves 2, a method where many clamp valves are arranged and they are sequentially opened/closed, and another method where two clamp valves 2 are regarded as one pair and four clamp valves 2 are opened/closed by shifting the positions of the tube 1 and the clamp valves 2 can be considered.

Further, in the case of culturing adhesion cells, a supporting material, such as micro-carrier, may be mixed into the culture medium.

FIG. 2 shows a functional block diagram of automatic subculturing device where the present invention device is applied to a portion of opening/closing clamp valves 2 and the flexible tube 1 in FIG. 1. This device is composed of a flexible tube, opening/closing clamp valves, an automatic opening/closing mechanism, a control mechanism and a stirring mechanism. As a technique of stirring, a method where a magnet rotor is enclosed in the flexible tube and the rotor is rotated using a stirrer from the outside of the flexible tube, or a method to strike the flexible tube from the outside is applicable, enabling unification of the contents in the fermenter and appropriate subculture. Further, in order to control the circumstances (temperature, humidity, gas ingredient) at the time of culturing, the device is used within an incubator.

#### [Efficacy of the Invention]

The present invention enables easy automation of subculturing of microscopic organisms or cells.



#### 4. Brief Description of Drawings

FIG. 1 is an explanatory diagram of an example, and FIG. 2 is a functional block diagram of automatic subculturing device where the present invention is applied.

Agent: Akira UCHIDA

Agent: Ryoichi HAGIWARA

Agent: Atsuo ANZAI

FIG. 1

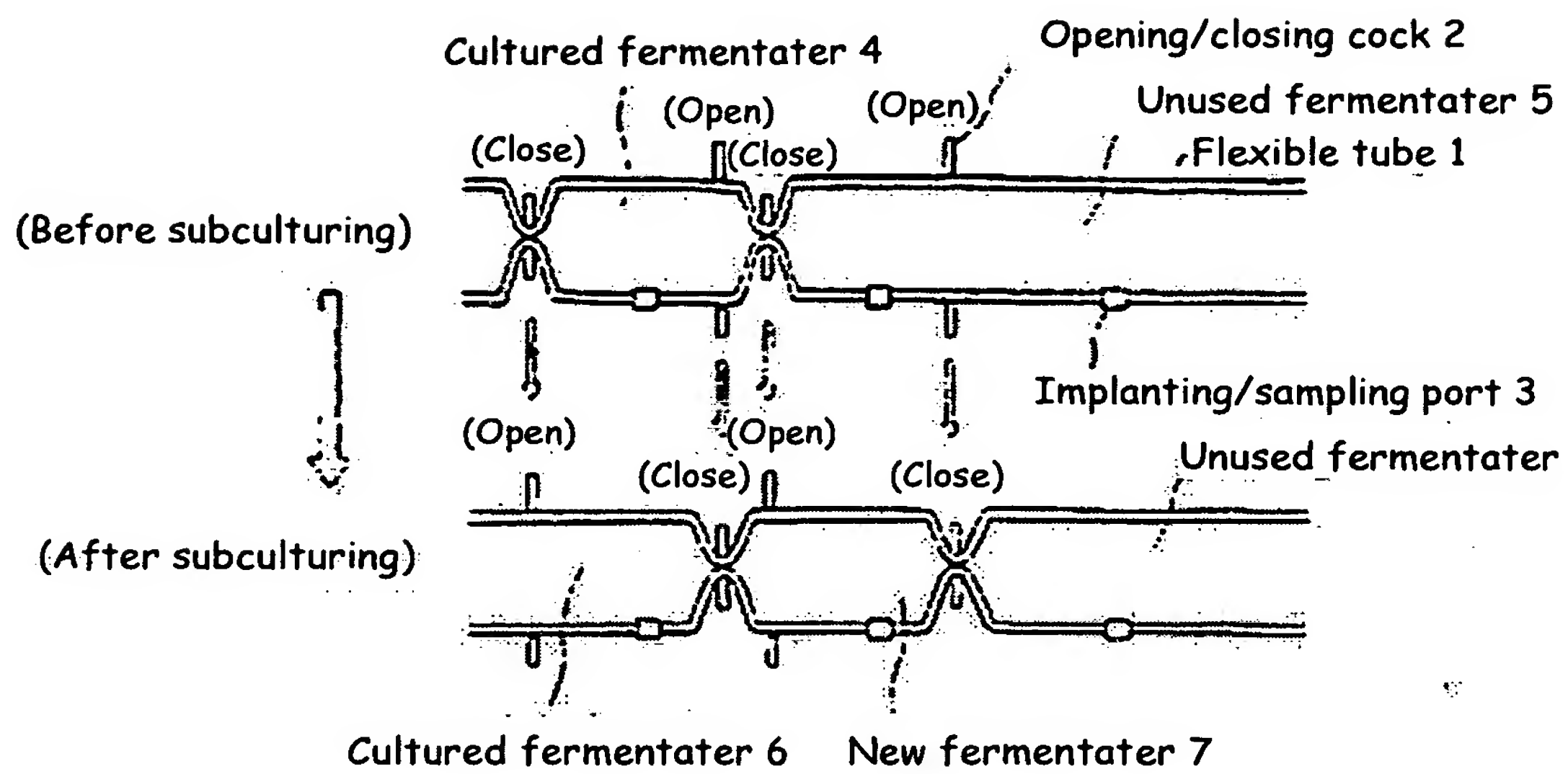
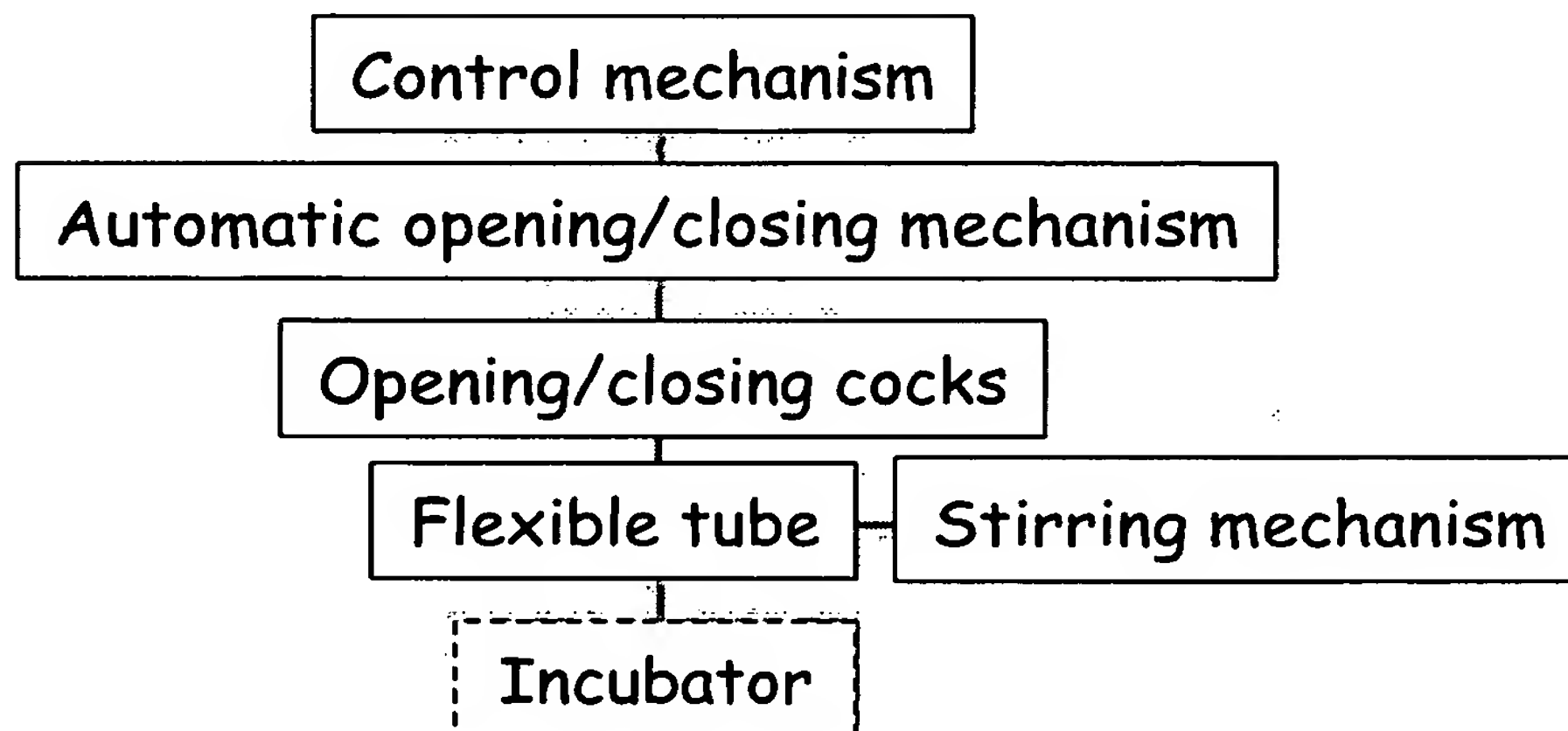


FIG. 2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**